

(21)

Neowaskularyzacja w tkankach oka: mechanizmy i rola czynników pro- i antyangiogennych

Neovascularization in ocular tissues: mechanisms and role of proangiogenic and antiangiogenic factors

Jerzy Z. Nowak, Anna Wiktorowska-Owczarek

Z Zakładu Farmakologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Jerzy Z. Nowak

Summary: Blood vessel growth and stability are under precise control of an array of pro- and anti-angiogenic factors. Under physiological conditions, actions of particular regulatory factors, as well as their mutual interactions are harmonized and balanced. Disruption of the balance between these pro- and anti-angiogenic factors is characteristic of many vascular diseases, including those occurring within the eye. Functional dominance of proangiogenic factors (e. g., vascular endothelial growth factor, VEGF) over antiangiogenic ones (e. g., pigment epithelium-derived growth factor, PEDF), which may occur under ischemic conditions, may initiate the process of retinal or choroidal neovascularization, representing a major threat to the eyesight. This article presents and discusses current ideas concerning molecular and cellular processes underlying aberrant growth on new blood vessels in ocular tissues, in relation to microvascular ocular complications associated mainly (but not only), with diabetes mellitus, age-related macular degeneration (AMD), and retinopathy of prematurity (ROP). This review also surveys latest achievements in the field of clinically more effective future therapeutic strategies, including gene therapy applicable to the neovascular eye diseases.

Słowa kluczowe: neoangiogeneza fizjologiczna i patologiczna, VEGF, MMP, PEDF, receptory integrynowe, ROP, DR, AMD.

Key words: neoangiogenesis physiological and pathological, VEGF, MMP, PEDF, integrins' receptors, ROP, DR, AMD.

Rozmieszczenie naczyń krwionośnych w tkankach oka ma kluczowe znaczenie dla funkcji narządu wzroku – tym bardziej że pewne rejony (np. rogówka, soczewka, szklistka, okolica plamki) u zdrowych osób pozostają awaskularne. Pojawiający się w różnych sytuacjach rozrost naczyń krwionośnych, określany terminem „neoangiogeneza” lub „neowaskularyzacja”, może być przyczyną poważnych zaburzeń widzenia, ze ślepotą włącznie.

Proces neoangiogenezy dotyczy rozrostu naczyń z już istniejących naczyń krwionośnych i należy go odróżniać od procesu waskulogenezy, który zachodzi w okresie rozwoju embrionalnego i jest fizjologicznym procesem tworzenia łożyska naczyniowego (19,22,35). Neoangiogeneza może występować w warunkach fizjologii (np. zmiany w endometrium podczas cyklu menstruacyjnego, tworzenie łożyska, zmiany w gruczołach sutkowych w okresie laktacji), w przebiegu procesów naprawczych (np. gojenie ran, zmiany w tkance serca po ischemii i zawale) oraz w sytuacjach patologicznych (np. wzrost nowotworowy, reumatoidalne zapalenie stawów, retinopatie) (6,12,13,22,24,31).

W oku proces neoangiogenezy może rozwijać się w każdym wieku, np. u noworodków (retinopatia wcześniaków; retinopathy of prematurity, ROP), osób dorosłych (retinopatia cukrzycowa; diabetic retinopathy, DR) oraz u pacjentów po 60. roku życia (starcze zwyrodnienie plamki; zwyrodnienie plamki związane z wiekiem; age-related macular degeneration, AMD). Neowaskularyzacja może także występować

w przebiegu szeregu innych schorzeń oka, np. w retinopatii związanej z niedokrwiistością sierpowatokrwinkową, w zakrzepie żyły środkowej siatkówki (bądź jej gałązki) oraz w przebiegu niektórych procesów zapalnych. Wymienione trzy pierwsze schorzenia, tj. ROP, DR i AMD, stanowią poważne wyzwanie dla współczesnych klinicystów, w krajach rozwiniętych bowiem są istotną przyczyną częściowej bądź całkowitej utraty wzroku. Według ostatnich danych epidemiologicznych autorów amerykańskich (1,23,50) ROP rozwija się u przynajmniej 5% wcześniaków z niską wagą urodzeniową, proliferacyjną postacią DR w skali roku obserwuje się u blisko 2% cukrzyków, a postać mokra (proliferacyjna) AMD występuje u ponad 7% osób powyżej 70. roku życia. Warto nadmienić, że postać suchą AMD, która często poprzedza wystąpienie formy mokrej, stwierdza się u co najmniej 10% osób pomiędzy 65. a 75. rokiem życia.

U noworodków o niskiej wadze urodzeniowej rozwijająca się retinopatia jest związana z poddawaniem dzieci tlenoterapii w inkubatorze (hiperoksja). Hiperoksja sprawia, że rozwijające się „fizjologiczne” naczynia krwionośne w tkankach oka ulegają obkurczeniu, dekompozycji i zanikowi. Po opuszczeniu inkubatora i w wyniku zaistniałych zmian regresyjnych w obrębie (ocznego) łożyska naczyniowego naturalne środowisko stanowi hipoksję, co z kolei jest przyczyną gwałtownego rozwoju nowych naczyń, głównie na bazie naczyń systemu siatkówkowego. W dużym zakresie stosowanym i wiarygodnym zwierzęcym modelem ludzkiej ROP jest tzw. retino-

patia indukowana tlenem (oxygen-induced retinopathy; OIR), wywołana ekspozycją rozwijającej się („dojrzewającej”) siatkówki na środowisko zawierające wysokie stężenia tlenu, najczęściej 75-80% (59). W takich warunkach fizjologiczny rozwój siatkówkowych naczyń krwionośnych myszy, szczura, psa (są to najczęściej wykorzystywane gatunki zwierząt do tego typu badań) jest zahamowany i dochodzi do zaniku ponad 60% naczyń – stan taki określany jest jako wazoobliteracja. Po umieszczeniu badanych zwierząt w warunkach normoksji (21% tlenu) istniejący układ naczyniowy jest niewystarczający, aby sprostał zapotrzebowaniu siatkówki na tlen – tkanka staje się niedotleniona, co sprawia, że uruchamiane są mechanizmy kompensacyjne (m. in. ekspresja czynników proangiogennych), stymulujące proces wazoproliferacji, szczególnie w obszarze przedsiatkówkowym.

Patomechanizm rozwoju DR jest natomiast typowym przykładem reakcji naczyń, a następnie tkanki siatkówki, na przewlekłe występujące w cukrzycy zaburzenia krążenia i niedokrwienie (70). W postaci proliferacyjnej DR (PDR) proces neowaskularyzacji bierze swój początek z siatkówkowego systemu naczyniowego, ze skłonnością przenikania nowo powstałych naczyń w kierunku szklistki (20,22).

W przypadku AMD dochodzi do powstawania druz (tzw. postać sucha, niewysiękowa AMD; typ zanikowy AMD). Wzrastająca ilość druz może jednak prowadzić do oddzielenia nabłonka barwnikowego od błony Brucha i odżywiającej zewnętrzne warstwy siatkówki błony naczyniowej i jej choriokapilarów. Niedotlenienie zewnętrznych warstw siatkówki prowokuje nowotwórstwo naczyniowe od strony naczyń włosowatych naczyniówki (postać mokra, wysiękowa AMD). Następuje rozrost podnaczyniówkowych naczyń krwionośnych do przestrzeni podsiatkówkowych, a następnie do siatkówki, często w rejonie plamki, co stanowi przyczynę poważnych komplikacji funkcji oka i dyskomfortu pacjenta. Nowo utworzone „patologiczne” naczynia są bardziej kręte w swoim przebiegu i charakteryzują się konstrukcją słabszą od naczyń „fizjologicznych”, są kruche i mają skłonność do przeciekania i krwawienia. Ponadto w dalszym etapie schorzenia formują się blizny włóknisto-naczyniówkowe, przyczyniając się do stopniowej i w końcu nieodwracalnej utraty wzroku. Należy zaznaczyć, że postać wysiękowa AMD może towarzyszyć postaci suchej (jak to opisano powyżej), a może również pojawiać się jako postać izolowana. W tym ostatnim przypadku etiopatogeneza schorzenia pozostaje nieznaną, chociaż sugeruje się, że u jego podstaw może leżeć dysfunkcja nabłonka barwnikowego siatkówki (RPE; retinal pigment epithelium), z zalegającymi i z wiekiem powiększającymi się złogami lipofuscyny, toczącym się stresem oksydacyjnym i nasilającym się procesem apoptozy komórek RPE (2,21,64). Najnowsze badania dowodzą, że w przypadku wystąpienia formy proliferacyjnej AMD i DR stwierdza się w tkankach oka, zarówno u ludzi, jak i w modelach zwierzęcych, podwyższone stężenia czynnika proangiogennego – VEGF (vascular endothelial growth factor) i obniżenie stężenia czynnika angiostatycznego – PEDF (pigment epithelium-derived factor), z towarzyszącą nasiloną proliferacją i migracją komórek endotelialnych (2,3,8,9,20,33,38,53,61).

Molekularne i komórkowe mechanizmy neowaskularyzacji

Mechanizmy odpowiedzialne za rozwój neowaskularyzacji nie są do końca poznane. Wyniki licznych badań doświadczalnych oraz obserwacji klinicznych potwierdzają pogląd, że funkcjonalnym pod-

łożem dla tego procesu, także w przebiegu ROP, DR i AMD, jest niedotlenienie tkanki, w czasie którego dochodzi do lokalnej ekspresji tzw. czynników proangiogennych (tab. I) (np. 19,35,42). Z drugiej strony najnowsze dane doświadczalne pokazują, że w tkance ischemicznej dochodzi również do zahamowania ekspresji tzw. czynników antyangiogennych, nazywanych także czynnikami angiostatycznymi (tab. I). Jest zatem bardzo prawdopodobne, że rozchwianie dynamicznej równowagi pomiędzy czynnikami proangiogennymi a angiostatycznymi, na korzyść tych pierwszych, tworzy sytuację stymulującą rozwój naczyń krwionośnych na bazie już istniejących naczyń. Należy zaznaczyć, że funkcjonalna dominacja czynnika/-ów proangiogennych niekoniecznie musi wiązać się z jego/ ich aktywacją, może ona wynikać z pierwotnego obniżenia produkcji i poziomów czynnika/-ów angiostatycznych.

Na podstawie danych z literatury pochodzących głównie z ostatnich 5 lat powstaje spójny obraz zjawisk molekularnych

| Czynniki proangiogenne/ Proangiogenic factors |
|---|
| Angiogenina |
| Angiopoetyna-1 |
| EGF (czynnik wzrostu naskórka; epidermal growth factor) |
| FGF (czynnik wzrostu fibroblastów; fibroblast growth factor) |
| GCSF (czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów; granulocyte colony-stimulating factor) |
| HGF (czynnik wzrostowy hepatocytów; hepatocyte growth factor) |
| IGF (insulinopodobny czynnik wzrostu; insulin-like growth factor) |
| IL-8 (interleukina-8) |
| MMP (metaloproteazy macierzy zewnątrzkomórkowej, matrix metalloproteases) |
| PAF (czynnik aktywujący płytki krwi; platelet activating factor) |
| PDGF (płytkopochodny czynnik wzrostu; platelet-derived growth factor) |
| TGF α , β (transformujący czynnik wzrostu α , β ; transforming growth factor α , β) |
| TNF- α (czynnik martwicy nowotworu α ; tumor necrosis factor) |
| VEGF (czynnik wzrostu śródbłonna naczyń; vascular endothelial growth factor) |
| Czynniki antyangiogenne/ Antiangiogenic factors |
| Angiostatyna (38-kDa fragment plazminogenu) |
| Endostatyna (20-kDa fragment kolagenu XVIII) |
| Interferon α |
| IIP-10 (10 kDa białko indukowane przez interferon; interferon-inducible protein-10) |
| Interleukina-12 |
| PEDF (czynnik pochodzący z nabłonka barwnikowego; pigment epithelium-derived factor) |
| PAI (inhibitor aktywatora plazminogenu; plasminogen activator inhibitor) |
| Trombospondyna-1, -2 |
| TIMP-1, -2, -3, -4 (tkankowe inhibitory metaloproteaz; tissue inhibitors of metalloproteinases) |
| Waskulostatyna |

Tab. I. Najczęściej wymieniane czynniki pro- i antyangiogenne. Czynniki wymienione w kolejności alfabetycznej, a więc bez implikacji stopnia ważności. Najważniejsze czynniki w swoich grupach zostały zaznaczone wytłuszczonym drukiem.

Tab. I. Most often pro-and antiangiogenic factors.

i procesów komórkowych leżących u podstaw neowaskularyzacji (6,10-13,19,25,28,31,35,39,42,48,54,63). Z uwagi na ograniczoną objętość niniejszego opracowania opis zachodzących procesów będzie przedstawiony skrótowo i w pewnym uproszczeniu. Tab. II przedstawia etapy angiogenezy wraz z zaznaczeniem czynników pełniących zasadniczą funkcję w poszczególnych etapach.

W oku zdrowego, dorosłego człowieka komórki śródbłonka naczyń są mitotycznie nieaktywne, czynniki zaś wzrostu naczyń pozostają w równowadze z czynnikami angiostatycznymi. Do powstania neowaskularyzacji dochodzi na skutek zaburzenia równowagi między czynnikami pro- i antyangiogennymi, co jest rezultatem niedokrwienia siatkówki. Na skutek niedotlenienia powstaje czynnik indukowany hipoksją, tzw. HIF-1 (hypoxia inducible factor-1), który z kolei zwiększa ekspresję czynnika wzrostu śródbłonka naczyń – VEGF (vascular endothelial growth factor).

HIF-1 jest heterodimerem złożonym z dwóch podjednostek: HIF-1 α i HIF-1 β . HIF-1 β jest podjednostką konstytutywną, podczas gdy ekspresja HIF-1 α w czasie normoksji pozostaje na niskim poziomie. W warunkach niedotlenienia obserwuje się stymulację syntezy HIF-1 α , który wiąże się z podjednostką β , tworząc aktywny biologicznie dimer HIF-1 $\alpha\beta$, znany jako czynnik HIF-1, a ten z kolei zwiększa ekspresję VEGF. VEGF, wiążąc się z receptorem VEGFR-2, znajdującym się na powierzchni komórek śródbłonka, prowadzi do fosforylacji czynników transkrypcyjnych przez kinazę MAP (MAPK; mitogen-activated protein kinase), w wyniku czego dochodzi do ekspresji odpowiednich genów białek biorących udział w angiogenezie. A zatem proces neoangiogenezy rozpoczyna się od powstania VEGF-u i aktywacji komórek śródbłonka przez ten czynnik.

W kolejnej fazie złożonego procesu neoangiogenezy dochodzi do degradacji błony podstawnej naczyń i macierzy zewnątrzkomórkowej, co ułatwia migrację komórek śródbłonka. Powstały w warunkach hipoksji VEGF zwiększa ekspresję białek integrynowych – komórki śródbłonka przekształcają się w komórki migrujące i nabierają zdolności do przemieszczania się. Na powierzchni komórek śródbłonka stwierdza się obecność receptorów komórkowych dla aktywatora plazminogenu uPAR (receptor aktywatora plazminogenu typu urokinazowego; urokinase-type plasminogen activator receptor) oraz receptorów integrynowych. Receptor uPAR po związaniu się z ligandem uPA (aktywator plazminogenu typu urokinazowego) przekształca plazminogen w plazminę. Plazmina jest enzymem proteolitycznym, który aktywuje metaloproteazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP, matrix metalloproteinases), takie jak: stromielizyna, żelatynaza, kolagenaza. Aktywne MMP degradują białka macierzy zewnątrzkomórkowej i błony podstawnej naczyń. Receptory integrynowe natomiast odpowiedzialne są za adhezję komórek śródbłonka

do białek macierzy zewnątrzkomórkowej, co umożliwia migrację tych komórek. Przemieszczanie, a następnie podział komórek śródbłonka odbywa się głównie dzięki VEGF, który zwiększa przepuszczalność naczyń krwionośnych, a także – wraz z zasadowym czynnikiem wzrostu fibroblastów (bFGF, basic fibroblast growth factor) i płytkopochodnym czynnikiem wzrostu (PDGF; platelet-derived growth factor) – stymuluje mitozę komórek śródbłonka. W wyniku podziałów komórek endotelialnych powstają kielki naczyń i tuby kapilarne. Następnie formujące się kapilary wydłużają się i udrażniają. Powstaje również błona podstawna. Skład błony podstawnej tak powstałych naczyń różni się od składu błony otaczającej prawidłowe naczynia między innymi większą zawartością kwasu hialuronowego, a mniejszą – proteoglikanu heparano-siarczanowego. Proces angiogenezy kończy powstanie połączeń naczyniowych (anastomoz) i utworzenie sieci naczyń, które charakteryzują się jednak znaczną kruchością i łamliwością.

W celu uzupełnienia powyższego opisu należy wspomnieć w kontekście angiogenezy w ischemicznej retinopatii o skomplikowanych obustronnych interakcjach pomiędzy VEGF a systemem sygnalizacyjnym: tlenek azotu/ cykliczny GMP (NO/cGMP), w których NO wykazuje działania zarówno pro-, jak i antyangiogenne. Niedotlenienie stymuluje produkcję NO najprawdopodobniej w sposób niezależny od HIF-1. Czynnik ten jest niezbędnym ogniwem łańcucha reakcji stymulowanych przez VEGF i prowadzących do proliferacji komórek endotelialnych i angiogenezy. Z drugiej strony VEGF stymuluje także syntezę NO w komórkach śródbłonka naczyniowego, a powstały NO może oddziaływać hamująco na stymulowaną przez HIF-1 produkcję VEGF, tworząc układ samoregulujący się na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego (efekt antyangiogenne). Prace z ostatnich 2-3 lat wykazały, że NO biorący udział w angiogenezie powstaje w wyniku aktywacji dwóch form syntazy NO (NOS; nitric oxide synthase): formy „endotelialnej” (eNOS) i formy „indukcyjnej” (iNOS; ujawniającej się w różnych komórkach pod wpływem transkrypcyjnej aktywacji przez endotoksyny i cytokiny) – obie formy ulegają aktywacji w siatkówce ischemicznej. Selektywne zahamowanie NOS (farmakologiczne bądź w modelach zwierząt transgenicznym z wyłączonym genem kodującym poszczególne formy NOS) prowadzi na ogół do osłabienia procesu neowaskularyzacji. Na podstawie danych uzyskanych na mysim modelu OIR-ROP sugeruje się istotną rolę szlaku iNOS/NO w rozroście nowo tworzonych naczyń z rejonu siatkówki do szkliski, a także udział w towarzyszącej ischemii apoptozie i degeneracji komórek siatkówki (29,36,37,56,57).

Ostatni nurt badań wskazuje na istotną rolę w siatkówkowej neowaskularyzacji, głównie w przebiegu ROP i DR, takich czynników, jak angiotensyna II i angiopoetyna-2, które stymulują proliferację komórek endotelialnych i migrację perycytów (52), oraz endotelin, które szczególnie w przebiegu DR zwiększają przepuszczalność naczyń i pobudzają syntezę białek macierzy zewnątrzkomórkowej (15,47).

VEGF, PEDF i inne elementy modulujące proces angiogenezy

Poszczególne etapy angiogenezy są regulowane przez różnorodne endogenne czynniki, pochodzące z wielu komórek i uaktywniane w określonych warunkach. Wśród tych czynników wyróżniamy grupę tzw. mediatorów rozpuszczalnych, grupę czynników związanych z macierzą zewnątrzkomórkową (ECM; extracellular

| Etapy angiogenezy Angiogenetic stages | Czynniki biorące udział Factors |
|---|--|
| 1. Aktywacja komórek śródbłonka | VEGF, FGF, PDGF |
| 2. Degradacja błony podstawnej naczyń i macierzy zewnątrzkomórkowej | MMP, UPA i uPAR, integryny, VEGF, bFGF |
| 3. Formowanie naczyń | VEGF, bFGF, PDGF |

Tab. II. Czynniki biorące udział w poszczególnych etapach angiogenezy. Wyjaśnienia skrótów – patrz tab. I.

Tab. II. Factors of angiogenesis.

matrix) i/ lub z błoną plazmatyczną, a także grupę czynników będących elementami samej ECM. Część z nich została przedstawiona powyżej. Pełniejszą listę czynników proangiogennych, a także endogennych czynników antyangiogennych, przedstawia tab. I. Według zgodnej opinii badaczy procesu neowaskularyzacji najważniejszym czynnikiem stymulującym angiogenezę jest VEGF. Z kolei najsilniej działającym endogennym czynnikiem antyangiogennym jest PEDF. Dlatego też w dalszej części niniejszego opracowania więcej uwagi poświęcimy tym dwóm związkom, mając jednakże świadomość, że rola pozostałych czynników w rozwoju „patologicznej” neowaskularyzacji, zarówno pro-, jak i antyangiogennych, jest również istotna.

VEGF – budowa i funkcje

VEGF – czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (vascular endothelial growth factor), odkryty na początku lat osiemdziesiątych, znany był przez blisko dekadę pod trzema nazwami: VEGF, „czynnik zwiększający przepuszczalność naczyń” (VPF, vascular permeability factor) oraz „waskulotropina” (vasculotropin). Dopiero sklonowanie w latach 1989-1991 wspomnianych trzech czynników dowiodło, że reprezentują one tę samą substancję.

VEGF reprezentuje grupę mediatorów „rozpuszczalnych”. Znanych jest obecnie 6 członków rodziny VEGF: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, wirusowy homolog VEGF (orf-virus VEGF; VEGF-E) i PlGF (placenta growth factor – łożyskowy czynnik wzrostu). Największą aktywność biologiczną w procesie angiogenezy wykazuje VEGF-A, który – jak się wkrótce okazało – nie jest strukturą jednorodną. W zależności od liczby aminokwasów wyróżnia się VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ i VEGF₂₀₆. Formy krótsze są związane z ECM, natomiast formy dłuższe są formami swobodnie dyfundującymi w obrębie ECM. VEGF jest dimeryczną glikoproteiną o masie cząsteczkowej 36-46 kDa, zawierającą sekwencję sygnałową w swoim N-końcu i domenę wiążącą heparynę. Rola biologiczna poszczególnych form VEGF może się różnić, np. VEGF-A zwiększa przepuszczalność naczyń i bierze udział w angiogenezie, rolę VEGF-B wiąże się z progresją guza niezależną od angiogenezy, VEGF-C i VEGF-D mają uczestniczyć w nowotworowej angiogenezie i limfoangiogenezie, natomiast PlGF zwiększa przepuszczalność naczyń oraz indukuje proliferację, chemotaksję i angiogenezę, a także działa synergistycznie z VEGF-A w patologicznej neowaskularyzacji. VEGF-E wykazuje również silne działanie proangiogenne (22,35).

Działania biologiczne wszystkich członków rodziny VEGF są realizowane poprzez specyficzne receptory znajdujące się na powierzchni komórek docelowych, które reprezentują trzy podtypy określane terminami: VEGFR-1, VEGFR-2 i VEGFR-3. Receptory dla VEGF-A to VEGFR-1 (zwane również skrótowo Flt-1 – fms-like tyrosine kinase) i VEGFR-2 (Flk-1 – fetal liver kinase-1 u myszy i KDR – kinase domain region u ludzi). Ligandami dla receptora VEGFR-1 są ponadto VEGF-B i PlGF. Na receptor VEGFR-2 działają, oprócz VEGF-A, także VEGF-C i VEGF-D, a na receptor VEGFR-3 (Flt-4) – VEGF-C i VEGF-D. Receptory VEGFR-1 i VEGFR-2 biorą udział w angiogenezie, natomiast receptory VEGFR-3 – w limfoangiogenezie. Wszystkie przenoszą sygnał mitogeny na komórki docelowe. Wymienione receptory swoją budową przypominają rodzinę receptorów dla PDGF (klasa III). Są homodimerami i składają się z trzech funkcjonalnych elementów: elementu zewnątrzkomórkowego zawierającego siedem domen o budowie zbliżonej do immunoglobuliny (tzw. domeny immunoglobulinopodobne), transbłonowej domeny hydro-

fobowej i wewnątrzkomórkowej domeny, która zawiera stałą sekwencję kinazy tyrozynowej. W obrębie VEGFR-1 wyróżnia się dwa podtypy: formę pełnej długości (VEGFR-1) i skróconą „rozpuszczalną” formę białka wiążącego VEGF (sVEGFR). Oba podtypy kodowane są przez ten sam gen (22,35).

W roku 1998 zidentyfikowano kolejny receptor dla VEGF, który wiąże formę VEGF₁₆₅ i który okazał się identyczny z ludzkim białkiem zwanym neuropiliną-1 (NP-1; jest ona receptorem dla rodziny kolapsyn i semaforyn, uczestniczących w procesie neurogenezy). Wkrótce okazało się, że NP-1 pełni funkcję koreceptora dla VEGF₁₆₅, nasilając wiązanie VEGF-A przede wszystkim do receptora VEGFR-2 (KDR) (60).

Ekspresja VEGF-A jest regulowana przez hipoksję, stężenie glukozy, pH, w warunkach bowiem niedotlenienia czynnik HIF-1 wiąże się z rejonem promotora genu VEGF i stymuluje jego tworzenie. Ponadto w warunkach ograniczonego dostarczenia tlenu następuje potranskrypcyjna stabilizacja mRNA dla VEGF-A.

Czynniki rodziny VEGF, przede wszystkim VEGF-A, są najistotniejszymi regulatorami rozwoju układu naczyń, które odpowiadają za stymulację angiogenezy. Czynniki te mają właściwości mitogenne oraz stymulują proliferację i migrację komórek śródbłonna. Ponadto zwiększają przeżywalność komórek endotelialnych *in vitro* i *in vivo*, o czym świadczy regresja naczyń w przypadku eliminacji VEGF zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych. Efekt ten wynika z oddziaływania stymulującego ekspresję genów rodziny bcl-2 (B-cell leukemia/ lymphoma-2) i A1, których produkty są inhibitorami apoptozy. VEGF aktywuje szereg genów dla czynników biorących udział w angiogenezie, np. geny dla receptorów integrynowych $\alpha_v\beta_5$, niezbędnych w powstawaniu naczyń. Istotną funkcją VEGF-u jest zwiększenie przepuszczalności naczyń, która ułatwia migrację komórek śródbłonna. W tym aspekcie jest on kilkadziesiąt tysięcy razy silniejszym czynnikiem przepuszczalności naczyń niż histamina (22,35).

Metaloproteazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP) i ich naturalne inhibitory

Komórki śródbłonna, konieczne do wytworzenia nowych naczyń krwionośnych, muszą pokonać wiele barier w postaci macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), błony podstawnej naczyń oraz ściany naczyń krwionośnych. Do ich pokonania wymagane są enzymy proteolityczne, takie jak MMP, zdolne do trawienia ECM oraz błony podstawnej naczyń. MMP biorą udział zarówno w procesach fizjologicznych (embriogeneza, rozwój osobniczy, gojenie ran, menstruacja, owulacja), jak i patologicznych, czego przykładem jest nowotworzenie naczyń w narządzie wzroku. MMP należą do rodziny endopeptydaz zależnych od jonów cynku i wapnia. Transkrypcja genów MMP jest regulowana przez produkty protoonkogenne, hormony oraz czynniki angiogenne. Regulacja aktywności MMP zależy również od proteolitycznych przemian zymogenów w formy aktywne. Większość metaloproteaz jest aktywowana przez plazminę, a więc ich aktywacja zależy od aktywności plazminogenu. Ponadto aktywność MMP jest regulowana poprzez tkankowe (endogenne) inhibitory metaloproteaz (TIMP, tissue inhibitors of metalloproteinases). TIMP są wydzielane przez fibroblasty, komórki endotelialne, a także chondrocyty i komórki mięśni gładkich. Opisano 4 tkankowe inhibitory metaloproteaz: TIMP-1, -2, -3 i -4. Obecność MMP i TIMP wykazano w próbkach szklistki uzyskanych po witrektomii u pacjentów cierpiących z powodu zaawansowanych postaci AMD, w tym przede wszystkim u pacjentów z proliferacyjną formą DR (np. 7,18,58).

Receptory integrynowe

Receptory integrynowe tworzą dużą rodzinę białek odpowiedzialnych za rozpoznawanie i przyleganie komórek do elementów ECM oraz oddziaływanie komórek między sobą. Są to heterodimery zbudowane z podjednostek α i β .

Badania *in vivo* i *in vitro* wykazały, że angiogeneza może zachodzić dzięki obecności receptorów integrynowych, zwłaszcza należących do rodziny α_v . Przeciwciała skierowane przeciwko integrynom $\alpha_v\beta_5$ lub $\alpha_v\beta_3$ hamują angiogenezę. Komórki śródbłonna są zdolne do migracji w ECM przy udziale odpowiednich integryn, takich jak $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_2\beta_1$. Od adhezji zależą również proliferacja i różnicowanie komórek, które zachodzą przy współudziale sygnałów pochodzących od integryn (32,51).

PEDF – budowa i funkcje

Czynnik pochodzący z nabłonka barwnikowego siatkówki (PEDF, pigment epithelium-derived factor) został odkryty w roku 1989 jako czynnik neurotroficzny o masie cząsteczkowej ok. 50 kDa. Powoduje on intensywne (> 90%) różnicowanie się komórek *retinoblastoma* (Y-79) w kierunku neuronów (67,68, patrz także 43). Analiza cDNA i sekwencji 418 reszt aminokwasowych w cząsteczce ludzkiego PEDF wskazuje na podobieństwo jego struktury do szeroko rozpowszechnionej w świecie roślin i zwierząt nadrodziny peptydowych inhibitorów proteaz serynowych, skrótowo określanej terminem „serpin” od „serine protease inhibitors”. Jednakże PEDF nie wykazuje w ogóle działania antyproteazowego (5). Poznanie struktury 1-rzędowej PEDF wykazało, że czynnik ten jest identyczny z tzw. czynnikiem EPC-1 (early population doubling level cDNA-1), którego ekspresję badano w komórkach WI-38 – linii fibroblastów pochodzących z tkanki płucnej ludzkiego embrionu oraz fibroblastów pochodzących z ludzkiego endometrium. Badania ekspresji EPC-1/PEDF pokazały, że produkcja peptydu jest silniejsza w komórkach młodych i ulega wyraźnemu zmniejszeniu w miarę ich starzenia się (np. 49,69). Taka dynamika ekspresji PEDF-mRNA i poziomów PEDF, potwierdzona także w przypadku ekspresji PEDF w tkankach oka (69), może mieć istotne implikacje funkcjonalne, szczególnie w regulacji tych procesów, których aktywacja i/ lub pojawienie się są ściśle związane z określonym etapem rozwoju bądź specyficznymi warunkami fizjologiczno-patologicznymi komórki/ organizmu.

Działania biologiczne PEDF realizowane są poprzez specyficzne receptory, których obecność stwierdzono, m. in. na ludzkich komórkach *retinoblastoma* Y-79, w tkankach oka (w tym w siatkówce) oraz na komórkach ziarnistych mózdzku i rdzeniowych neuronach ruchowych. Taka lokalizacja receptorów dla PEDF koreluje z opisywanymi w literaturze efektami neurotroficznymi i neuroprotektynnymi peptydu w wielu modelach zwierzęcych, a w odniesieniu do siatkówki – w modelu zależnej od H_2O_2 śmierci neuronów siatkówki szczura, dysmorfogenezy fotoreceptorów i siatkówkowych komórek Mullera czy ischemicznego uszkodzenia siatkówki (patrz 43).

Działanie antyangiogenne PEDF opisano po raz pierwszy zaledwie kilka lat temu (17). Badania porównawcze siły działania antyangiogenne PEDF wykazały, że czynnik ten pod względem skuteczności przeciwdziałania procesowi neowaskularyzacji dominuje wśród znanych dotychczas czynników antyangiogennych (14,17). Ostatnie prace donoszą o podwyższeniu i jednoczesnym obniżeniu ekspresji, odpowiednio, VEGF i PEDF w modelu ischemicznej neowaskularyzacji siatkówki (26) oraz u pacjentów z odklejeniem siatkówki i proliferacyjnym zwyrodnieniem siatkówkowo-szklistkowym

(44). Ponadto obniżone poziomy PEDF obserwowano w pooperacyjnych próbkach ciała szklistego pacjentów cierpiących z powodu DR (8,9,45,61) i AMD (33). Wykazano także aktywność terapeutyczną PEDF w zapobieganiu retinopatii wywołanej niedotlenieniem (62). Uzyskiwane wyniki zgodne są z ideą, zgodnie z którą homeostaza „naczyniowa” w narządzie wzroku jest warunkowana utrzymaniem równowagi głównie pomiędzy VEGF a PEDF. Potwierdzają też koncepcję, że zwiększenie poziomu VEGF i/ lub zmniejszenie PEDF, a więc stan funkcjonalnej dominacji aktywności proangiogennej, inicjuje proces angiogenezy. Pomiedzy VEGF a PEDF istnieje silna zależność, VEGF bowiem, działając na receptory VEGFR-1 (ale nie VEGF-2), stymuluje ekspresję PEDF, natomiast zastosowanie przeciwciał anti-VEGF powoduje zmniejszenie poziomu PEDF (46). Nie jest znany mechanizm leżący u podstaw właściwości antyangiogennych PEDF. Przypuszcza się, że wynikają one z hamowania migracji, proliferacji i wzrostu komórek śródbłonna. Ponadto PEDF hamuje aktywność kinazy MAP (MAPK) indukowanej przez VEGF (patrz 43).

Ze względu na swoje właściwości (aktywność antyangiogenna, neuroprotektynna i neurotroficzna) oraz swój endogenny charakter PEDF stał się obiektem intensywnych badań nad możliwością wykorzystania cząsteczki w terapii schorzeń oka nie tylko z toczącym się procesem neowaskularyzacji, ale także z procesem neurodegeneracji siatkówki. Pierwsze próby terapii genowej (której celem jest uruchomienie ekspresji PEDF) w modelach zwierzęcych wydają się niezwykle obiecujące (30,41,55).

Tab. III przedstawia podstawowe aspekty „oczne” PEDF, z któ-

| Typ komórek | In vitro efekty PEDF |
|--|---|
| Fotoreceptory | intensyfikuje rozwój i przedłuża żywotność |
| Neurony | zapobiega degeneracji i apoptozie |
| Komórki nabłonka barwnikowego (RPE) | główne źródło PEDF w oku; synteza intensywna w młodych komórkach RPE i obniża się z ich wiekiem |
| Retinoblastoma (hodowane komórki siatkówczaka) | stymuluje różnicowanie w kierunku fenotypu neuronalnego |
| Śródbłonek naczyń | hamuje tworzenie nowych naczyń (działanie antyangiogenne) |

Tab. III. Działanie PEDF na komórki tkanek oka.

Tab. III. PEDF on ocular tissues influence.

rych szereg może odnosić się równie dobrze do innych tkanek/ narządów w przypadkach np. wzrostu nowotworowego (16,71).

Chociaż badania nad potencjałem antyangiogennym PEDF w ocznej neowaskularyzacji zdają się obecnie dominować, warto przynajmniej wspomnieć o dwóch innych endogennych czynnikach – trombospondynie i endostatynie, które również mogą odgrywać rolę w przeciwdziałaniu procesowi neowaskularyzacji. Wykazano bowiem, że trombospondyna-1 (TSP-1), glikoproteinowy składnik ECM, wykazuje właściwości hamujące proliferację i migrację komórek endotelialnych, a także angiogenezę. Czynnik ten może być wytwarzany przez komórki nabłonka barwnikowego i może uczest-

niczyć w kontroli zarówno naczyniówkowej, jak i siatkówkowej neowaskularyzacji (40). Wykazano również ekspresję TSP-1 w zależności od niedotlenienia neowaskularyzacji w siatkówce (65).

Endostatyna, 20-kDa fragment kolagenu XVIII, jest znanym endogennym inhibitorem angiogenezy zachodzącej we wzrastającym guzie. Ostatnie badania grupy Campochiaro (66) zwróciły uwagę na jej podobne działanie w obrębie oka. Autorzy wykazali, że wewnątrzoczną ekspresja tego czynnika antagonizowała szereg procesów wywołanych przez VEGF, w tym zależny od VEGF wzrost przepuszczalności naczyń siatkówki, neowaskularyzację i odklejenie siatkówki. Powyższe dane sugerują, że – z jednej strony – czynniki doprowadzające do uruchomienia procesu neowaskularyzacji lub już toczący się proces indukują w tkankach oka mechanizmy przeciwdziałające tworzeniu się nowych naczyń (np. PEDF, endostatyna, TSP-1). Skuteczność działania tych nowo generowanych czynników antyangiogennych wydaje się zależeć od aktywności proangiogennej danej tkanki i możliwości jej funkcjonalnego zrównoważenia. Z drugiej strony – endogenne czynniki antyangiogenne stanowią potencjalny naturalny mechanizm obronny, który – w przypadkach zagrażającej bądź już występującej neowaskularyzacji – może być pobudzony (a nawet odnowiony) przez zastosowanie odpowiednich podejść terapeutycznych, z terapią genową łącznie.

Leczenie patologicznej neowaskularyzacji w tkankach oka jest w przededniu nowej ery możliwych zastosowań terapeutycznych. Dotychczas stosowane zabiegi, w tym przede wszystkim laserokoagulacja czy terapia fotodynamiczna, a także ostatnio wprowadzana reofereza, połączone z zabiegiem witrektomii w przypadku wzrastania nowo tworzonych naczyń do szklistki, są wciąż udoskonalane i w wielu przypadkach skutecznie poprawiają komfort pacjenta – jednakże nie leczą one przyczyny neoangiogenezy występującej np. w AMD, PDR czy ROP. Przyczyna – choć może być zróżnicowana (porównaj np. PDR z AMD) – leży bowiem w dysfunkcji procesów molekularnych, indukowanych najczęściej (choć nie zawsze) przez niedotlenienie tkanki. Jak opisano powyżej, nowotworzenie naczyń, także w obrębie oka, polega na aktywacji w gruncie rzeczy procesów fizjologicznych, jednakże z patologicznym i często dramatycznym w skutkach finałem – naczynia krwionośne powstają bowiem tam, gdzie ich być nie powinno. Powstają jednakże dlatego, że fizjologiczne (endogenne) czynniki antyangiogenne (np. PEDF, TSP-1, endostatyna; patrz tab. I) nie równoważą aktywności czynników proangiogennych (np. VEGF). Koncepcje nowych terapii mogących znaleźć już niedługo zastosowanie w klinice okulistycznej zasadzają się zatem na założeniu, że – aby zlikwidować bezpośrednią przyczynę procesu neowaskularyzacji – należy skutecznie obniżyć aktywność VEGF bądź podwyższyć aktywność PEDF, bądź zastosować oba podejścia jednocześnie. Próby takie są już stosowane, a wyniki uzyskiwane w modelach zwierzęcych są bardzo obiecujące. Preparat RhuFab jest obecnie w III fazie badań klinicznych. Wykazano, że zastosowanie inhibitorów VEGF (aptamer anty-VEGF, monoklonalne przeciwciała wobec VEGF – np. RhuFab) oraz inhibitorów szlaków sygnalizacyjnych sprzężonych z receptorami dla VEGF (np. inhibitor PLC- β czy inhibitor PKC), daje dobre rezultaty w formie wysiękowej AMD i proliferacyjnej DR czy w cukrzycowym obrzęku plamki (np. 4,30,34). Z drugiej strony zastosowanie doocznego (lub przyocznego) molekularnych wektorów zmierzających do uruchomienia ekspresji (a więc podniesienia syntezy i poziomów) PEDF w tkankach oka daje nad-

zwyczaj dobre efekty terapeutyczne w modelach zwierzęcych ROP, AMD i DR (np. 41,55,71). Zatem pierwszy krok w kierunku skuteczniejszej terapii schorzeń przebiegających z neowaskularyzacją w tkankach oka został już dokonany. Przed nami pozostały próby kliniczne, które – miejmy nadzieję – zakończą się sukcesem.

PIŚMIENNICTWO: 1. Aiello L. M.: *Perspectives on diabetic retinopathy*. Am. J. Ophthalmol., 2003, 136, 122-135. 2. Algere P. V., Seregard S.: *Age-related maculopathy: pathogenetic features and new treatment modalities*. Acta Ophthalmol. Scand., 2002, 80, 136-143. 3. Amin R., Puklin J. E., Frank R. N.: *Growth factor localization in choroidal neovascular membranes of age-related macular degeneration*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1994, 35, 3178-3188. 4. Bainbridge J., Mistry A., Alwis M. D., Paleolog E., Baker A., Thrasher A. J., Ali R. R.: *Inhibition of retinal neovascularization by gene transfer of soluble VEGF receptors sFlt-1*. Gene Ther., 2002, 9, 320-326. 5. Becerra S. P., Sagasti A., Spinella P., Notario V.: *Pigment epithelium-derived factor behaves like a noninhibitory serpin*. J. Biol. Chem., 1995, 43, 25992-25999. 6. Bikfalvi A., Bicknell R.: *Recent advances in angiogenesis, anti-angiogenesis and vascular targeting*. Trends Pharmacol. Sci., 2002, 23, 576-582. 7. Bishop P.: *Matrix metalloproteinases and their natural inhibitors*. Br. J. Ophthalmol., 2000, 84, 1087-1089. 8. Boehm B. O., Lang G., Volpert O., Jehle P. M., Kurkhaus A., Rosinger S., Lang G. K., Bouck N.: *Low content of the natural ocular anti-angiogenic agent pigment epithelium-derived factor (PEDF) in aqueous humor predicts progression of diabetic retinopathy*. Diabetologia, 2003, 46, 394-400. 9. Boehm B. O., Lang G., Feldmann B., Kurkhaus A., Rosinger S., Volpert O., Lang G. K., Bouck N.: *Proliferative diabetic retinopathy is associated with a low level of the natural ocular anti-angiogenic pigment epithelium-derived factor (PEDF) in aqueous humor. A pilot study*. Horm. Metab. Res., 2003, 35, 382-286. 10. Browder T., Folkman J., Pirie-Shepherd S.: *The hemostatic system as a regulator of angiogenesis*. J. Biol. Chem., 2000, 275, 1521-1524. 11. Bussolino F., Mantovani A., Persico G.: *Molecular mechanisms of blood vessel formation*. Trends Biochem. Res., 1997, 22, 251-256. 12. Campochiaro P. A.: *Retinal and choroidal neovascularization*. J. Cell. Physiol., 2000, 184, 301-310. 13. Carmeliet P., Jain R. K.: *Angiogenesis in cancer and other diseases*. Nature, 2000, 407, 249-257. 14. Chader G. J.: *PEDF: Raising both hopes and questions in controlling angiogenesis*. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 2001 Feb, 27, 98 (5), 2122-2124. 15. Chakrabarti S., Khan Z. A., Cukiernik M., Fukuda G., Chen S., Mukherjee S.: *Alteration of endothelins: a common pathogenic mechanism in chronic diabetic complications*. Int. J. Exp. Diab. Res., 2002, 3, 217-231. 16. Crawford S. E., Stellmach V., Ranalli M., Huang X., Huang L., Volpert O., De Vries G. H., Abramson L. P., Bouck N.: *Pigment epithelium-derived factor (PEDF) in neuroblastoma: a multifunctional mediator of Schwann cell antitumor activity*. J. Cell. Sci., 2001, 114, 4421-4428. 17. Dawson D. W., Volpert O. V., Gillis P., Crawford S. E., Xu H. J., Benedict W., Bouck N. P.: *Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis*. Science, 1999, 285, 245-248. 18. De La Paz M. A., Itoh Y., Toth C. A., Nahase H.: *Matrix metalloproteinases and their inhibitors in human vitreous*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1998, 39, 1256-1260. 19. Distler O., Neidhart M., Gay R. E., Gay S.: *The molecular control of angiogenesis*. Intern. Rev. Immunol., 2002, 21, 33-49. 20. Duh E., Aiello L. P.: *Vascular endothelial growth factor and diabetes*. Diabetes, 1999, 48, 1899-

1906. 21. Fauser S., Engelmann K., Krohne T. U., Lappas A., Kirchhof B., Jousseaume A. M.: *Pathogenesis der choroidalen Neovaskularisation*. Ophthalmologie, 2003, 100, 300-305. 22. Ferrara N.: *Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications*. Semin. Oncol., 2002, 29 (Suppl. 16), 10-14. 23. Fine S. L., Berger J. W., Mguire M. G., Ho A. C.: *Age-related macular degeneration*. N. Engl. J. Med., 2000, 342, 483-492. 24. Folkman J.: *Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease*. Nat. Med., 1995, 1, 27-31. 25. Forsythe J. A., Jiang B. H., Iyer N. V., Agani F., Leung S. W., Koos R. D., Semenza G.: *Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1*. Mol. Cell. Biol., 1996, 16, 4604-4613. 26. Gao G., Li Y., Zhang D., Gee S., Crosson C., Ma J.: *Unbalanced expression of VEGF and PEDF in ischemia – induced retinal neovascularization*. FEBS Lett., 2001, 489, 270-276. 27. Gardner T. W., Antonetti D. A., Barber A. J., LaNoue K. F., Levison S. W.: *Diabetic retinopathy: more than meets the eye*. Surv. Ophthalmol., 2002, 47 (Suppl. 2), S253-S262. 28. Gariano R. F., Kalina R. E., Hendrickson A. E.: *Normal and pathological mechanisms in retinal vascular development*. Surv. Ophthalmol., 1996, 40, 481-490. 29. Gelinas D. S., Bernatchez P. N., Rollin S., Bazan N. C., Sirois M. G.: *Immediate and delayed VEGF-mediated NO synthesis in endothelial cells: role of PI3K, PKC and PLC pathways*. Br. J. Pharmacol., 2002, 137, 1021-1030. 30. Ghelbach P., Demetriades A. M., Yamamoto S., Deering T., Xiao W. H., Duh E. J., Yang H. S., Lai H., Kovacs I., Carrion M., Wei L., Campochiaro P. A.: *Periocular gene transfer of sFlt-1 suppresses ocular neovascularization and vascular endothelial growth factor-induced breakdown of the blood-retinal barrier*. Human Gene Ther., 2003, 14, 129-141. 31. Griffioen A. W., Molema G.: *Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation*. Pharmacol. Rev., 2000, 52, 237-268. 32. Hodivala-Dilke K. M., Reynolds A. R., Reynolds L. E.: *Integrins in angiogenesis: multitasked molecules in a balancing act*. Cell. Tissue Res. (2003, w druku). 33. Holekamp N. M., Bouck N., Volpert O.: *Pigment epithelium-derived factor is deficient in the vitreous of patients with choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration*. Am. J. Ophthalmol., 2002, 134, 220-227. 34. Honda M., Sakamoto T., Ishibashi T., Inomata H., Ueno H.: *Experimental subretinal neovascularization is inhibited by adenovirus-mediated soluble VEGF-Flt-1 receptor gene transfection: a role of VEGF and possible treatment for SRN in age-related macular degeneration*. Gene Ther., 2000, 7, 978-985. 35. Joussila L., Alitalo K.: *Vascular growth factors and lymphangiogenesis*. Physiol. Rev., 2002, 82, 673-700. 36. Keshet E.: *More weapons in the arsenal against ischemic retinopathy*. J. Clin. Invest., 2001, 107, 945-946. 37. Kimura H., Esumi H.: *Reciprocal regulation between nitric oxide and vascular endothelial growth factor in angiogenesis*. Acta Biochem. Pol., 2003, 50, 49-59. 38. Kliffen M., Sharma H. S., Mooy C. M., Kerkvliet S., de Jong P. T. V. M.: *Increased expression of angiogenic growth factors in age-related maculopathy*. Br. J. Ophthalmol., 1999, 81, 154-162. 39. Maxwell P. H., Ratcliffe P. J.: *Oxygen sensors and angiogenesis*. Semin. Cell Dev. Biol., 2002, 13, 29-37. 40. Miyajima-Uchida H., Hayashi H., Beppu R., Kuroki M., Fukami M., Arakawa F., Tomita Y., Kuroki M., Oshima K.: *Production and accumulation of thrombospondin-1 in human retinal pigment epithelium cells*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2000, 41, 561-567. 41. Mori K., Gehlbach P., Yamamoto S., Duh E., Zack D. J., Li Q., Berns K. I., Raisler B. J., Hauswirth W. W., Campochiaro P. A.: *AAV-Mediated gene transfer of pigment epithelium-derived factor inhibits choroidal neovascularization*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2002, 43, 1994-2000. 42. Neely K. A., Gardner T.: *Ocular Neovascularization*. Am. J. Pathol., 1998, 153, 665-670. 43. Nowak J. Z.: *Czynnik pochodzący z bablonka barwnikowego (PEDF) – potencjał neuroprotektoryjny, neurotroficzny i rola w regulacji angiogenezy*. [W:] Neuroprotekcja (red. M. Śmiałowska), Instytut Farmakologii PAN, Mogilany, 2003 (w druku). 44. Ogata N., Nishikawa M., Nishimura T., Mitsuma Y., Matsumura M.: *Inverse levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor in the vitreous of eyes with rhegmatogenous retinal detachment and proliferative vitreoretinopathy*. Am. J. Ophthalmol., 2002, 133, 851-852. 45. Ogata N., Tombran-Tink J., Nishikawa M., Nishimura T., Mitsuma Y., Sakamoto T., Matsumura M.: *Pigment epithelium derived factor in the vitreous is low in diabetic retinopathy and high in rhegmatogenous retinal detachment*. Am. J. Ophthalmol., 2001, 132, 378-382. 46. Ohno-Matsui K., Yoshida T., Uetama T., Mochizuki M., Morita I.: *Vascular endothelial growth factor upregulates pigment epithelium-derived factor expression via VEGFR-1 in human retinal pigment epithelial cells*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2003, 303, 962-967. 47. Oku H., Kida T., Sugiyama T., Hamada J., Sato B., Okeda T.: *Possible involvement of endothelin-1 and nitric oxide in the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy*. Retina, 2001, 21, 674-681. 48. Ozaki H., Yu A. Y., Della N., Ozaki K., Luna J. D., Yamada H., Hackett S. F., Okamoto N., Zack D. J., Semenza G. L., Campochiaro P. A.: *Hypoxia inducible factor-1alpha is increased in ischemic retina: temporal and spatial correlation with VEGF expression*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1999, 40, 182-189. 49. Palmieri D., Watson J. M., Rinehart C. A.: *Age-related expression of PEDF/EPC-1 in human endometrial stromal fibroblasts: implications for interactive senescence*. Exp. Cell. Res., 1999, 247, 142-147. 50. Reynolds J. D.: *The management of retinopathy of prematurity*. Paediatr. Drugs, 2001, 3, 263-272. 51. Ruegg C., Mariotti A.: *Vascular integrins: pleiotropic adhesion and signaling molecules in vascular homeostasis and angiogenesis*. Cell. Mol. Life Sci., 2003, 60, 1135-1157. 52. Salros S., Rizkalla B., Moravski C. J., Cao Z., Cooper M. E., Wilkinson-Berka J. L.: *Retinal angiogenesis is mediated by an interaction between the angiotensin type 2 receptor, VEGF, and angiopoietin*. Am. J. Pathol., 2003, 163, 879-887. 53. Schlingemann R. O., van Hinsbergh V. M. M.: *Role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in eye disease*. Br. J. Ophthalmol., 1997, 81, 501-512. 54. Semenza G. L.: *Hypoxia-inducible factor 1: control of oxygen homeostasis in health and disease*. Pediatr. Res., 2001, 49, 614-617. 55. Semkova I., Kreppel F., Welsandt G., Luther T., Kozłowski J., Janicki H., Kochanek S., Schraermeyer U.: *Autologous transplantation of genetically modified irid pigment epithelial cells: a promising concept for the treatment of age-related macular degeneration and other disorders of the eye*. Proc. Acad. Sci., USA, 2002, 99, 13090-13095. 56. Sennlaub F., Courtois Y., Goureau O.: *Inducible nitric oxide synthase mediates the change from retinal to vitreal neovascularization in ischemic retinopathy*. J. Clin. Invest., 2001, 107, 717-725. 57. Sennlaub F., Courtois Y., Goureau O.: *Inducible nitric oxide synthase mediates retinal apoptosis in ischemic proliferative retinopathy*. J. Neurosci., 2002, 22, 3987-3993. 58. Sethi C. S., Bailey T. A., Luthert P. J., Chong N. H.: *Matrix metalloproteinase biology applied to vitreoretinal disorders*. Br. J. Ophthalmol., 2000, 84, 654-666. 59. Smith L. E. H., Wesolowski E., McLellan A., Kostyk S. K., Amato R. D., Sullivan R., D'Amore P. A.: *Oxygen-induced retino-*

- pathy in the mouse*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1994, 35, 101-111. **60.** Soker S., Takashima S., Miao H. Q., Neufeld G., Klagsbrun M.: *Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor*. Cell., 1998, 92, 735-745. **61.** Spranger J., Osterhoff M., Reimann M., Mohlig M., Ristow M., Francis M. K., Cristofalo V., Hammes H. P., Smith G., Boulton M., Pfeiffer A. F. H.: *Loss of the antiangiogenic pigment epithelium-derived factor in patients with angiogenic eye disease*. Diabetes, 2001, 50, 2641-2645. **62.** Stellmach V., Crawford S. E., Zhou W., Bouck N.: *Prevention of ischemia-induced retinopathy by the natural ocular antiangiogenic agent pigment epithelium-derived factor*. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 2001, 98, 2593-2597. **63.** Stone J., Itin A., Alon T., Pe'er J., Gnessin H., Chan-Ling T., Keshet E.: *Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia*. J. Neurosci., 1995, 15, 4738-4747. **64.** Suter M., Reme C., Grimm C., Wenzel A., Jaattela M., Esser P., Kociok N., Leist M., Richter C.: *Age-related macular degeneration*. J. Biol. Chem., 2000, 275, 39625-39630. **65.** Suzuma K., Takagi H., Otani A., Oh H., Honda Y.: *Expression of thrombospondin-1 in ischemia-induced retinal neovascularization*. Am. J. Pathol., 1999, 154, 343-354. **66.** Takahashi K., Saishin Y., Saishin Y., Silva R., Oshima Y., Oshima S., Melia M., Paszkiet B., Zerby D., Kadan M. J., Liao G., Kaleko M., Connelly S., Luo T., Campochiaro P. A.: *Intraocular expression of endostatin reduces VEGF-induced retinal vascular permeability, neovascularization, and retinal detachment*. FASEB J., 2003, 17, 896-898. **67.** Tombran-Tink J., Johnson L. V.: *Neuronal differentiation of retinoblastoma cells induced by medium conditioned by human RPE cells*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1989, 30, 1700-1707. **68.** Tombran-Tink J., Chader G. J., Johnson L. V.: *PEDF: a pigment epithelium-derived factor with potent neuronal differentiative activity*. Exp. Eye Res., 1991, 53, 411-414. **69.** Tombran-Tink J., Shivaram S. M., Chader G. J., Johnson L. V., Bok D.: *Expression, secretion, and age-related downregulation of pigment epithelium-derived factor, a serpin with neuroprotective activity*. J. Neurosci., 1995, 15, 4992-5003. **70.** Vinik A., Flemmer M.: *Cukrzyca jako choroba naczyń krwionośnych*. J. Diabetes Complications, PL, 2003, 1, 7-19. **71.** Wang L., Schmitz V., Perez-Mediavilla A., Izal I., Prieto J., Qian C.: *Suppression of angiogenesis and tumor growth by adenoviral-mediated gene transfer of pigment epithelium-derived factor*. Mol. Ther., 2003, 8, 72-79.

Praca wpłynęła do Redakcji 23.10.2003 r. (341).

Adres do korespondencji (Reprint requests to):
 Jerzy Z. Nowak
 Z-d Farmakologii Uniwersytetu Medycznego
 ul. Muszyńskiego 1
 90-151 Łódź